

The contribution of kinetics and mutagenesis studies to the knowledge of ligand-protein interactions of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase

Doctoral Thesis

Author(s):

Gerber, Susanna Dorothea

Publication date:

1997

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001783638>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**The Contribution of Kinetics and Mutagenesis Studies to the
Knowledge of Ligand-Protein Interactions of Herpes Simplex
Virus Type 1 Thymidine Kinase**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Susanna Dorothea Gerber
pharmacist (eidg. dipl. Apothekerin)
10. November, 1967
from Langnau I.E.

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. G. Folkers, examiner
Prof. Dr. V. Pliska, co-examiner
Dr. R. Hofbauer, co-examiner



1997

ETHICS ETH-BIB



00100003172331

Summary

The Herpes Simplex Virus type 1 thymidine kinase (HSV 1 TK) catalyzes the phosphorylation of thymidine (dT) in the presence of adenosine triphosphate (ATP). HSV 1 TK exhibits a low substrate specificity. It phosphorylates thymidine analogs (e.g. BVdU and IdU) and it is able to phosphorylate purine analogs, even those carrying an acyclic sugar moiety (e.g. aciclovir (ACV) and ganciclovir). These nucleoside analogs have been recognized as potent inhibitors of HSV replication. More recently, non-substrate analogs (e.g. N²-phenylguanines and uridine analogs with substitutions at the 5'OH group) of the viral TKs have been synthesized and they were found to prevent reactivation from latency. Thus, the differences in substrate specificity between the viral and the host cell TKs are a key for selective and efficient antiviral therapy.

Site-directed mutants of HSV 1 TK were constructed in order to analyze substrate binding and catalytic properties of the HSV 1 TK. Several site-directed mutagenesis techniques (based on single stranded DNA or polymerase chain reaction (PCR) methods) were tested for the HSV 1 TK gene which exhibits a high G/C content of up to 68%. Since the single stranded TK DNA seems to have a high propensity to form stable secondary structures, the best mutagenesis results were achieved using PCR. The three primer PCR method described by Barretino [Barretino, 1994] was used.

The wild-type and the mutants of HSV 1 TK were expressed in *E. coli* as a thrombin-cleavable glutathione S-transferase fusion protein and purified to homogeneity in a one-step procedure as previously described [Fetzer, 1994]. The proteolytic cleavage of the fusion protein with thrombin led to a truncated TK, resulting from two new and hitherto unknown thrombin cleavage sites in the TK sequence [Fetzer, 1994]. A stability study was carried out and revealed the full-length TK being much more stable in diluted solutions than the truncated one, which lacks the first 32 N-terminal amino acids. The stability can be increased for both truncated and full-length TK by addition of the substrate ATP and/or dT to the diluted enzyme solution.

A coupled UV-spectrophotometric assay involving pyruvate kinase and lactate dehydrogenase was established for activity measurements and ATP kinetics. Additionally, the standard nucleoside kinase assay, the DEAE-paper method, was optimized in terms of quantitative detection of the paper-adsorbed ^3H -dTMP, which was achieved by cellulase digestion of the DEAE paper prior to scintillation counting.

The truncated recombinant TK revealed K_m values of $0.2\ \mu\text{M}$ for thymidine and $45\ \mu\text{M}$ for ATP. The kinetic behaviour of ACV was linear, and preliminary results showed K_m values of $170\ \mu\text{M}$ for ACV and $26\ \mu\text{M}$ for ATP. Graphical analyses of the kinetic experiments indicated a steady state behaviour with a sequential order of substrate binding with ATP binding after substrate (dT or ACV) addition.

Several TK mutants were expressed. Among others, the active site mutants Q125L, Q125E and Q125N should clarify the electrostatic contribution of Q125 to substrate binding. Q125E was completely inactive, while Q125L was still able to phosphorylate dT, however, with a dramatically increased K_m value of $1\ \text{mM}$. Q125L was not able to phosphorylate ACV. In contrast, Q125N retained dT and ACV conversion activity with K_m values of $10\ \mu\text{M}$ and $555\ \mu\text{M}$, respectively. As expected, the K_m of ATP remained unchanged for both active mutants relative to the wild-type TK. These results confirm the quantum chemical calculations suggesting the electrostatics of the active site playing a major role in substrate binding.

We subjected several active HSV 1 TK mutants to structural considerations based on the crystal structure solved by Wild [Wild, 1995]. All five amino acid positions, namely T63, Q125, A168, R176, and C336, may refer drug resistance when mutated. However, the molecular mechanisms are considerably different. T63 is essential for magnesium binding, while Q125 is important for electrostatic attraction and binding of the substrate. A168 is a „space keeper“ and if mutated to bulkier residues, it will exclude binding of bigger substrate analogs. R176 seems to be essential for the electrostatic balance within the active site and C336 disrupts the three-dimensional structure of the whole active site by shifting the LID domain.

Zusammenfassung

Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase (HSV 1 TK) katalysiert die Phosphorylierung von Thymidin (dT) in Anwesenheit von ATP. Sie besitzt ein breites Substratspektrum und phosphoryliert Thymidinanaloga (z.B. BVdU und IdU) sowie Purinanaloga, sogar solche, die einen azyklischen Zuckerrest tragen (z.B. Acyclovir (ACV) und Gancyclovir). Diese Nucleosidanaloga sind potente Inhibitoren der HSV-Vermehrung. Kürzlich wurden Nicht-Substrat-Analoga der viralen TK (z.B. N²-Phenylguanine und Uridinanaloga mit Substitutionen an der 5'OH Gruppe) synthetisiert, welche eine Reaktivierung des Virus aus der Latenz unterdrücken. In der Differenz der Substratspezifität zwischen der viralen und der Wirtszellen-TK liegt der Schlüssel für eine selektive und effiziente antivirale Therapie.

Einzelne Aminosäuren wurden gezielt in der HSV 1 TK ausgetauscht, um die Substratbindung und die katalytischen Eigenschaften der TK zu untersuchen. Verschiedene Punktmutationstechniken (Einzelstang-DNA und Polymerasekettenreaktion(PCR) Methoden) wurden am HSV 1 TK-Gen getestet, welches einen hohen Gehalt an G/C (bis zu 68%) besitzt. Die einzelsträngige DNA hat eine grosse Tendenz zur Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen, weshalb sich die PCR-Methode besser eignete. Die von Baretino [Baretino, 1994] beschriebene Drei-Primer-Methode wurde schliesslich angewendet.

Der Wildtyp und die Mutanten der HSV 1 TK wurden in *E. coli* als ein durch Thrombin spaltbares Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein exprimiert und in einem Ein-Schritt-Prozess gereinigt [Fetzer, 1994]. Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins führte zu einer N-terminal verkürzten TK in Folge zweier zusätzlicher, bislang unbekannter, Thrombinspaltstellen in der TK-Sequenz [Fetzer, 1994]. Eine Stabilitätsstudie zeigte, dass die unverkürzte TK in Verdünnung stabiler ist als die verkürzte TK. Durch Zugabe von ATP und/oder Thymidin zu der verdünnten Enzymlösung kann die Stabilität für beide TKs erhöht werden.

Für Enzymaktivitätsmessungen und ATP-Kinetiken wurde ein Pyruvatkinase- und Laktatdehydrogenase- gekoppeltes UV-spektrometrisches

Experiment entwickelt. Zusätzlich wurde der Standardnukleosidkinase-assay, die DEAE-Papiermethode, optimiert. Eine quantitative Detektion des papier-gebundenen ^3H -dTMP's wurde durch Zellulaseverdau des DEAE-Papiers vor der Scintillationszählung erreicht.

Die verkürzte, rekombinante TK zeigte K_m Werte von $0.2 \mu\text{M}$ für dT und $45 \mu\text{M}$ für ATP. Für ACV wurden lineare Kinetiken gemessen und noch zu verifizierende Resultate zeigen K_m Werte von $170 \mu\text{M}$ für ACV und $26 \mu\text{M}$ für ATP. Die Kinetikexperimente wurden graphisch analysiert. Sie weisen auf ein Briggs-Haldane-Fliessgleichgewichtssystem hin mit einer sequentiell geordneten Anlagerung der Substrate, wobei zuerst dT (oder ACV) und anschliessend ATP bindet.

Die Mutanten Q125L, Q125E und Q125N wurden zur Aufklärung des elektrostatischen Beitrags von Glutamin 125 zur Thymidinbindung hergestellt. Die Q125L Mutante vermochte dT zu phosphorylieren, zeigte jedoch einen dramatisch erhöhten K_m Wert von 1 mM für dT und setzte kein ACV mehr um. Q125E war dagegen vollständig inaktiv. Q125N konnte dT und ACV phosphorylieren mit K_m Werten von $10 \mu\text{M}$ für dT und $555 \mu\text{M}$ für ACV. Wie erwartet waren die K_m Werte für ATP relativ zum Wildtyp unverändert bei beiden aktiven Mutanten. Diese Resultate bestätigen die quantenmechanischen Rechnungen, welche nahelegen, dass die Elektrostatik eine wichtige Rolle bei der Substratbindung spielt.

Verschiedene, aktive Mutanten der HSV 1 TK wurden anhand der Kristallstruktur des Wildtyps detailliert strukturell untersucht. Alle fünf untersuchten Positionen, T63, Q125, A168, R176 und C336, bewirken eine Arzneistoffresistenz, wenn sie mutiert werden, allerdings als Folge verschiedenster Mechanismen. T63 ist essentiell für die Magnesiumbindung. Q125 hingegen ist für die elektrostatische Anziehung und die Bindung von Thymidin zuständig. A168 wirkt wie ein „Platzhalter“. Falls mit sperrigeren Aminosäuren ausgetauscht, wird die Bindung von grösseren Substraten durch diese Punktmutation verhindert. R176 ist für die elektrostatische Balance in der Bindungstasche verantwortlich und Mutationen an C336 bewirken eine räumliche Umorientierung der LID Domäne.